

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/77384 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB01/00713

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. April 2001 (06.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 19 173.8 7. April 2000 (07.04.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexander [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE).
PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwarzkopffs-
trasse 7 B, 10115 Berlin (DE). BERLIN, Kurt [DE/DE];
Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/77384 A2

(54) Title: DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP'S) AND CYTOSINE-METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: DETEKTION VON SNPs UND CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a set of oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA) oligomers and to a method suited for detecting cytosine methylations and single nucleotide polymorphisms (SNP's) in genomic DNA samples. Said method is used for diagnosing and/or prognosing detrimental occurrences for patients or individuals such as medical disorders.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren und ein Verfahren, das sich zur Detektion von Cytosin-Methylierungen und SNPs in genomischen DNA-Proben eignet. Dieses Verfahren dient der Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wie Erkrankungen.

Detektion von SNPs und Cytosin-Methylierungen

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen repräsentativen Satz von Oligonukleotiden oder PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren, welche sich zum gleichzeitigen Detektieren von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) und Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben zur Unterscheidung von Zelltypen besonders eignet, sowie ein verwendetes Verfahren.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

Stand der Technik

Das Humangenomprojekt, die Erstsequenzierung des menschlichen Genoms, wird in den nächsten Jahren abgeschlossen werden. Durch dieses Projekt wird es möglich werden, alle etwa 100.000 Gene zu identifizieren. Die Sequenzinformation öffnet ungeahnte Möglichkeiten für die Aufklärung der Genfunktionen. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zu betreiben. Die Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zielt auf den Einsatz von Medikamenten in Abhängigkeit eines Genotypen. Dadurch soll die Effektivität von Medikamenten gesteigert werden. Der notwendige Zwischenschritt ist die Bestimmung der Po-

lymorphismen und Genotypen, die mit einem bestimmten Ansprechen assoziiert sind. Verlangt werden deshalb immer effizientere Genotypisierungsmethoden.

5 Derzeit gibt es zwei Kategorien von polymorphen Markern, die zur Genotypisierung eingesetzt werden, Mikrosatelliten und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Mikrosatelliten sind hoch polymorph, d.h. sie haben eine Vielzahl von Allelen. Sie sind dadurch charakterisiert, dass ein
10 repetitives Sequenzelement, mit einer unterschiedlichen Anzahl Wiederholungen für unterschiedliche Allele, von konservierten Sequenzen flankiert ist. Durchschnittlich gibt es einen Mikrosatellitenmarker pro 1 Million Basen. Eine Karte von 5.000 positionierten Mikrosatellitenmarkern wurde von CEPH publiziert. Mikrosatelliten werden
15 durch die Größenbestimmung von Produkten einer PCR mit Primern der konservierten, flankierenden Sequenz genotypisiert. Die Fluoreszenz markierten PCR Produkte werden auf Gelen aufgetrennt.

20

Es gibt vergleichsweise wenige beschriebene SNP Marker. Eine Karte mit 300.000 SNP Markern wird derzeit vom SNP Konsortium entwickelt und wird öffentlich zugänglich sein. Sind die SNP Marker identifiziert, können sie genomischen Positionen zugeordnet werden. Es ist angestrebt,
25 150.000 SNP Marker bis zum Jahr 2001 zu kartieren (Mas-hall, E. (1999); Science, 284, 406-407). Es gibt eine Handvoll Genotypisierungsmethoden für SNPs. Einige basieren auf der Auftrennung von Produkten auf Gelen, wie der
30 oligonucleotide ligase assay (OLA). Er eignet sich daher eher für den mittleren Durchsatz. Andere vertrauen auf reine Hybridisierung, die jedoch nicht die gleiche Stringenz hat. DNA Arrays (DNA chip) eignen sich für die Analyse einer großen Anzahl SNPs in einer beschränkten Anzahl von Individuen. Bis jetzt sind Beispiele gezeigt
35 worden, in denen 1.500 SNPs auf einem DNA Chip genotypi-

siert wurden. Die wirkliche Stärke von DNA Chips liegt in Ansätzen, wie der Resequenzierung und der Expressionsanalyse. Ansätze weiche Primerverlängerung anwenden sind gezeigt worden (Head, S. R. et al., (1999); Mol Cell Probes, 13(2), 81-87). Diese haben den Vorteil, wenn mit fluoreszenzmarkierten Terminatorbasen gearbeitet wird, dass die Resultate mit einem einfachen ELISA Lesegerät gesammelt werden können.

Es gibt einige SNP Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometrie zur Analyse verwenden. Diese haben den wesentlichen Vorteil, dass die allelspezifischen Produkte eine physische Darstellung der Produkte sind und nicht ein z. B. fluoreszierendes Signal, dass indirekt dem Produkt zugeordnet wird.

Die Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI) hat die Analytik von Biomolekülen revolutioniert (Karas, M. & Hillenkamp, F. Anal. Chem. 60, 2299-2301 (1988)). MALDI ist in verschiedenen Varianten zur Analyse von DNA eingesetzt worden. Die Varianten reichen von primer extension bis Sequenzierung (Liu, Y.-H., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 735-743 (1995); Ch'ang, L.-Y., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 772-774 (1995); Little, D.P., et al. J. Mol. Med. 75, 745-750 (1997); Haff, L. & Smirnov, I.P. Genome Res. 7, 378-388 (1997), Fei, Z., Ono, T. & Smith, L.M. Nucleic Acids Res. 26, 2827-2828 (1998); Ross, P., Hall, L., Smirnov, I. & Haff, L. Nature Biotech. 16, 1347-1351 (1998); Ross, P.L., Lee, K. & Belgrader, P. Anal. Chem. 69, 4197-4202 (1997); Griffin, T.J., Tang, W. & Smith, L.M. Nature Biotech. 15, 1368-1372 (1997)). Der größte Nachteil all dieser Methoden ist, dass alle eine gründliche Aufreinigung der Produkte vor der MALDI Analyse bedingen. Spin column Aufreinigung oder der Einsatz von

magnetic bead technology oder reversed-phase Aufreinigung sind notwendig.

Die Analyse von DNA im MALDI ist stark abhängig vom Ladungszustand des Produktes. Eine 100-fache Verbesserung der Empfindlichkeit in der MALDI Analyse kann dadurch erzielt werden, dass der Ladungszustand auf dem zu analysierenden Produkt so kontrolliert wird, dass nur eine einzige positive oder negative Überschussladung vorhanden ist. So modifizierte Produkte sind auch wesentlich weniger anfällig auf die Ausbildung von Addukten (z.B. mit Na und K, Gut, I.G. and Beck, S. (1995) Nucleic Acids Res., 23, 1367-1373; Gut, I.G., Jeffery, W.A., Pappin, D.J.C. and Beck, S. Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 43-50 (1997)). Ein SNP Genotypisierungsverfahren, welches von diesen Bedingungen Gebrauch macht, mit dem Namen "GOOD Assay" wurde kürzlich vorgestellt (Sauer, S. et al., Nucleic Acids Research, Methods online, 2000, 28, e13).

Die am häufigsten in der DNA eukaryotischer Zellen kovalent modifizierte Base ist 5-Methylcytosin. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer

Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255. Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer

Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "PrimerExtension-Reaktion" (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-A 95/00669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO-A 99/28498).

Weitere Publikationen die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261 WO-A 97/46705 und WO-A 95/15373.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Aufgabenstellung

Die vorliegende Erfindung soll einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren und ein Verfahren bereitstellen, welche sich zum gleichzeitigen Detektieren von SNPs (single nucleotide polymorphisms) und Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben besonders eignen.

10

Beschreibung

Die Aufgabe wird also durch einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA gelöst, wobei die Basensequenzen ausgewählt sind aus SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

20

Es ist ferner erfindungsgemäß, dass der erfindungsgemäße Satz sowohl die Basensequenzen mit der SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 selbst und/oder die durch Verlängerung, Verkürzung oder Veränderung der genannten Sequenzen mit der SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 enthält. Der erfindungsgemäße Satz kann sich erfindungsgemäß also aus unveränderten Sequenzen und/oder in erfindungsgemäßer Weise veränderten Sequenzen zusammensetzen.

30

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Satz von Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) zur Detektion von Single Nucleotide Polymorphismen und/oder des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, der besonders bevorzugt mindestens 10 der aufgeführten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-

35

ID: 382046 umfasst, oder aber mindestens 10 PNA-Oligomer oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die dort aufgelisteten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

5

In einer weiteren Variante des Verfahrens umfasst der Satz von Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) zur Detektion von Single Nucleotid Polymorphismen und/oder des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA mindestens 100 Oligonukleotid oder PNA Sequenzen, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber mindestens 100 PNA-Oligomere oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die dort aufgelisteten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

Besonders bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder C sein können.

Besonders bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA wiederum dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder G sein können.

Bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA dadurch gekennzeichnet, dass die Basense-

quenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder C sein können.

- 5 Bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende je-
10 weils um mindestens zwei weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder G sein können.

- Der Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten
15 genomischen DNA ist besonders bevorzugt dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase weggelassen wird.

- 20 Der Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers
25 mindestens zwei Nukleobasen weggelassen werden.

- Ein repräsentativer Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren, umfassend Oligomere und/oder Oligonukleotide gemäß den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046,
30 soll zur Detektion von Cytosin-Methylierungen und Einzelnukleotidpolymorphismen in genomischer DNA zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung verwendet werden. Dazu werden die folgenden Verfahrensschritte nacheinander ausgeführt:
35

Im ersten Verfahrensschritt wird eine genomische DNA Probe derart chemisch behandelt, dass an der 5'-Position un-

5 methylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base verwandelt werden.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-

10 Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Bevorzugt wird dazu die oben beschriebene Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse verwendet, die zu

15 einer Umwandlung nicht methylierter Cytosin-Nukleobasen in Uracil führt.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch, wobei eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet wird.

20

In einem zweiten Verfahrensschritt werden aus der chemisch vorbehandelten genomischen DNA mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert, die jeweils weniger als 2000 Basenpaare lang sind unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide als Primer.

25

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden.

30

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens sind unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-

35

Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet.

5 Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

10 Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren, die mindestens 10 der oben genannten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

15 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durch.

20 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegen die Basensequenzen des erfindungsgemäßen Satzes von Oligonukleotiden, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vor, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

25 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegen die Basensequenzen des erfindungsgemäßen Satzes von Oligonukleotiden mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Base verlängert vor, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

30 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegen die Basensequenzen des erfindungsgemäßen Satzes von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes mehrheitlich
35 am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei

weitere Basen verlängert vor, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

5 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird ein Satz von PNA-Oligomeren aus den oben genannten Basensequenzen verwendet, wobei jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase weggelassen wird.

10 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird ein Satz von PNA-Oligomeren aus den oben genannten Basensequenzen verwendet, wobei jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers mindestens zwei Nukleobasen weggelassen werden.

15 In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen, nämlich ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes verwendet, oder aber mindestens 10
20 PNA-Oligomer oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die oben genannten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens
25 werden mindestens 100 der oben genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen, nämlich ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes verwendet, oder aber mindestens
30 100 PNA-Oligomer oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die oben genannten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens ist
mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden.
35

In einer erneut bevorzugten Variante des Verfahrens sind unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet.

- 5 Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

- 10 Im letzten Schritt des Verfahrens detektiert man die hybridisierten Amplifikate. Die an den Amplifikaten angebrachten Markierungen sind an jeder Position der Festphase identifizierbar, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet.

- 15 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen.

- In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Markierungen der Amplifikate Radionuklide.

- 20 In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens tragen die Amplifikate ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

- 25 In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen.

- 30 In einer erneut bevorzugten Variante des Verfahrens weisen die erzeugten Fragmente im Massenspektrometer zur besseren Detektierbarkeit eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

- 35 Der erfindungsgemäße Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren dient bevorzugt zur Diagnose und/oder

Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen.

Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen verwendet, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; aggressive Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnverletzungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung verwendet.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, das mindestens 10 Oligonukleotide oder PNA-Oligomere und Primer zur Herstellung der Amplifikate sowie eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens enthält.

35

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA , wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA , wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase weglassen wird.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oligomers mindestens zwei Nukleobasen weglassen werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 100 der oben nachstehend genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Verfahren zur Analyse eines repräsentativen Satzes von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben zur Unterscheidung von Zelltypen.

Im ersten Schritt des Verfahrens wandelt man in einer genomischen DNA Probe durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymidin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um.

Im zweiten Schritt des Verfahrens amplifiziert man aus dieser chemisch behandelten genomischen DNA mehr als zehn unterschiedliche Fragmente, die jeweils weniger als 2000 Basenpaare lang sind unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide als Primer.

Im dritten Schritt des Verfahrens hybridisiert man die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren, umfassend mindestens 10 der oben genannten Sequenzen ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 oder aber Sequenzen, welche in der oben beschriebenen Weise verlängert, verkürzt oder verändert wurden.

Im vierten Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

Im letzten Verfahrensschritt detektiert man die hybridisierten Amplifikate.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden sind.

- 5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 10 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.
- 15 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 20 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 30 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.
- 35 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikate ablösbare Massenmarkierungen tragen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

5

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.

10

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen sind.

15

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.

30

Gegenstand der Erfindung ist zudem die Verwendung eines Satzes von mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen.

35

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Verwendung eines Satzes von mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen', Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schädigungen oder Krankheit; aggressive Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnverletzungen, psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes, Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist zudem die Verwendung eines Satzes von mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, enthaltend mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10
5 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, und Primer zur Herstellung der Amplifikate sowie eine Anleitung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

10 *Das Sequenzprotokoll mit den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 liegt der Internationalen Anmeldung in elektronisch lesbarer Form bei und ist Bestandteil dieser Anmeldung.*

15

Patentansprüche

1. Satz von Oligonukleotiden oder PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, ausgewählt aus den Basensequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.
2. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.
3. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.
4. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert

vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

- 5 5. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzel-
nukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide po-
lymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes
in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach An-
spruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basense-
10 quenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende
jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert
vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein
können.
- 15 6. Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur
Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs,
single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-
Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter ge-
nomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
20 net, dass jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oli-
gomers eine Nukleobase weggelassen wird.
- 25 7. Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur
Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs,
single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-
Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter ge-
nomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
30 net, dass jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oli-
gomers mindestens zwei Nukleobasen weggelassen wer-
den.
- 35 8. Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder
PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-
Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide
Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer
DNA, umfassend mindestens 10 der Oligonukleotid oder
PNA Sequenzen der Ansprüche 1 bis 7.

9. Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 100 der Oligonukleotid oder PNA Sequenzen der Ansprüche 1 bis 7.
10. Verfahren zur Analyse eines repräsentativen Satzes von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben zur Unterscheidung von Zelltypen, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:
- a) in einer genomischen DNA Probe wandelt man durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymidin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um;
 - b) aus dieser chemisch behandelten genomischen DNA amplifiziert man mehr als zehn unterschiedliche Fragmente, die jeweils weniger als 2000 Basenpaare lang sind unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide als Primer;
 - c) man hybridisiert die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren, umfassend mindestens 10 Sequenzen der Ansprüche 1 bis 9;
 - d) man entfernt die nicht hybridisierten Amplifikate;
 - e) man detektiert die hybridisierten Amplifikate.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet,
dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchfuhrt.
- 5
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11 dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgefuhrt wird.
- 10
13. Verfahren nach einem der Anspruche 10 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden sind.
- 15
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 20
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.
- 25
16. Verfahren nach einem der Anspruche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 30
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 35

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.
- 10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate ablösbare Massenmarkierungen tragen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 15 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17 dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 20 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 21 dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 25 23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22 dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
- 30 24. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen sind.
- 35 25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von meh-

reren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.

- 5 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17 dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
- 10 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 26, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon
15 umfasst.
- 20 28. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen.
- 25 29. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren gemäß Anspruch 28 zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; aggressive Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnverletzungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit
30 des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung,
35

- Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
- 5
30. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 10
31. Kit, enthaltend mindestens 10 Oligonukleotide oder PNA-Oligomere gemäss Anspruch 1 und Primer zur Herstellung der Amplifikate sowie eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 10 bis 27.
- 15

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/077384 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68,
G01N 33/50, C12N 15/11

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB01/00713

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. April 2001 (06.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 19 173.8 7. April 2000 (07.04.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, IT, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): OLEK, Alexander [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE). PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwartzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE). BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5, 10178 Berlin-Mitte (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 25. Juli 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP'S) AND CYTOSINE-METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: DETEKTION VON SNPs UND CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a set of oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA) oligomers and to a method suited for detecting cytosine methylations and single nucleotide polymorphisms (SNP's) in genomic DNA samples. Said method is used for diagnosing and/or prognosing detrimental occurrences for patients or individuals such as medical disorders.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren und ein Verfahren, das sich zur Detektion von Cytosin-Methylierungen und SNPs in genomischen DNA-Proben eignet. Dieses Verfahren dient der Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wie Erkrankungen.

WO 01/077384 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 01/00713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application the whole document --- -/--	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2001

Date of mailing of the international search report

05.04.02

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bradbrook, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte — al Application No

PCT/IB 01/00713

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WANG D G ET AL: "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome"</p> <p>SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 280, 1998, pages 1077-1082, XP002089398</p> <p>ISSN: 0036-8075</p> <p>page 1077, column 3, paragraph 1 -page 1078, column 3, paragraph 3</p> <p>page 1080, column 1, paragraph 1 -column 3, paragraph 2; figure 3</p> <p>---</p>	1-31
Y	<p>WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4 May 1995 (1995-05-04)</p> <p>page 19, line 6 -page 33, line 31</p> <p>page 78, line 3 -page 81, line 33</p> <p>---</p>	1-31
Y	<p>REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 10, 1998, pages 2255-2264, XP002143106</p> <p>ISSN: 0305-1048</p> <p>page 2258, column 2, paragraph 2 -page 2261, column 2, paragraph 1; figure 2</p> <p>---</p>	1-31
Y	<p>HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 9821-9826, XP002910406</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>abstract; table 1</p> <p>page 9822, column 1, paragraph 2 - paragraph 3</p> <p>---</p>	1-31
Y	<p>NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS**"</p> <p>ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, vol. 38, no. 19, 1999, pages 3039-3043, XP000961724</p> <p>ISSN: 0044-8249</p> <p>page 2865, column 1, paragraph 1 -page 2866, column 1, paragraph 1</p> <p>page 2866, column 2, paragraph 2 -page 2867, column 2, paragraph 2; figure 3</p> <p>-----</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 01/00713

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ **Claims Nos. 1-31 (in part), 28, 29**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210
2. ☒ **Claims Nos. 1-31 (in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210
3. ☐ **Claims Nos.:**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims Nos. 1-31 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Additional matter PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. (1-31) in part

Continuation of Field I.1

Although Claims Nos. 28 and 29 refer to a diagnostic method that is performed on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

Continuation of Field I.1

Claims Nos. 1-31 (in part), 28, 29

Claims Nos. 28, 29: PCT Rule 39.1(iv) – Diagnostic method that is performed on the human/animal body.

Continuation of Field I.2

Claims Nos. 1-31 (in part)

Invention 1 refers to an excessively large number of possible oligomer sets, which have SEQ ID NO: 1 and/or 2 as well as microarrays, which contain these sets. In fact, Invention 1 comprises so many permutations whereby resulting in an absence of clarity. In addition, the claims are not concisely worded. As a result, it is impossible to conduct a meaningful and complete search. The search for oligomer sets, which have SEQ ID NO: 1 and/or 2 is limited to SEQ ID NO: 1 and 2.

Had the applicant paid additional fees for one or more inventions that had not been searched up to now, the same problems with regard to clarity would have arisen. Only an incomplete search would have likewise been possible.

The applicant is therefore advised that patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also, as a rule, does not carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the event that the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the event that the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 01/00713

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9928498	A	10-06-1999	DE 19754482 A1	01-07-1999
			AU 2408599 A	16-06-1999
			CA 2310384 A1	10-06-1999
			CN 1283235 T	07-02-2001
			WO 9928498 A2	10-06-1999
			EP 1034309 A2	13-09-2000
			HU 0100424 A2	28-06-2001
			JP 2001525181 T	11-12-2001
			PL 341681 A1	23-04-2001
			US 6214556 B1	10-04-2001

WO 9511995	A	04-05-1995	AU 8126694 A	22-05-1995
			EP 0730663 A1	11-09-1996
			JP 9507121 T	22-07-1997
			WO 9511995 A1	04-05-1995
			US 6156501 A	05-12-2000
			US 6045996 A	04-04-2000
			US 6309823 B1	30-10-2001
			US 5861242 A	19-01-1999
			US 5837832 A	17-11-1998

PCT/JP 01/00713

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 G01N33/50 C12N15/11

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-31

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05.04.02

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bradbrook, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WANG D G ET AL: "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome"</p> <p>SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 280, 1998, Seiten 1077-1082, XP002089398 ISSN: 0036-8075 Seite 1077, Spalte 3, Absatz 1 -Seite 1078, Spalte 3, Absatz 3 Seite 1080, Spalte 1, Absatz 1 -Spalte 3, Absatz 2; Abbildung 3 ---</p>	1-31
Y	<p>WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4. Mai 1995 (1995-05-04) Seite 19, Zeile 6 -Seite 33, Zeile 31 Seite 78, Zeile 3 -Seite 81, Zeile 33 ---</p>	1-31
Y	<p>REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 Seite 2258, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 2261, Spalte 2, Absatz 1; Abbildung 2 ---</p>	1-31
Y	<p>HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 93, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung; Tabelle 1 Seite 9822, Spalte 1, Absatz 2 - Absatz 3 ---</p>	1-31
Y	<p>NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS**"</p> <p>ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, Bd. 38, Nr. 19, 1999, Seiten 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 Seite 2865, Spalte 1, Absatz 1 -Seite 2866, Spalte 1, Absatz 1 Seite 2866, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 2867, Spalte 2, Absatz 2; Abbildung 3 -----</p>	1-31

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. **1-31(zum Teil), 28,29**
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. **1-31(zum Teil)**
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-31 (in part)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-31(zum Teil)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 28 und 29 ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, umfassen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Ansprüche Nr.: 1-31(zum Teil),28,29

Ansprüche 28,29: Regel 39.1(iv) PCT - Diagnostizierverfahren, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen werden.

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-31(zum Teil)

Erfindung 1 bezieht sich auf eine außerordentliche Zahl von möglichen Oligomersätzen, welche SEQ ID NO:1 und/oder 2 umfassen sowie Microarrays, welche diese Sätze enthalten. Tatsächlich umfasst Erfindung 1 so viele Permutationen, daß sich ein Mangel an Klarheit ergibt. Ferner sind die Ansprüche nicht knapp gefasst. Dadurch ist eine sinnvolle und komplette Recherche unmöglich. Die Recherche für Oligomersätze, welche SEQ ID NO:1 und/oder 2 umfassen, ist auf SEQ ID NO:1 und 2 begrenzt worden.

Würde der Anmelder zusätzliche Gebühren für eine oder mehrere Erfindungen, die bisher nicht Recherchiert wurden, bezahlen, würde sich das gleiche Klarheitsproblem ergeben. Es wäre ebenfalls nur eine unvollständige Recherche möglich.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkürzungen

PCT/77B 01/00713

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9928498	A	10-06-1999	DE	19754482 A1	01-07-1999
			AU	2408599 A	16-06-1999
			CA	2310384 A1	10-06-1999
			CN	1283235 T	07-02-2001
			WO	9928498 A2	10-06-1999
			EP	1034309 A2	13-09-2000
			HU	0100424 A2	28-06-2001
			JP	2001525181 T	11-12-2001
			PL	341681 A1	23-04-2001
			US	6214556 B1	10-04-2001

WO 9511995	A	04-05-1995	AU	8126694 A	22-05-1995
			EP	0730663 A1	11-09-1996
			JP	9507121 T	22-07-1997
			WO	9511995 A1	04-05-1995
			US	6156501 A	05-12-2000
			US	6045996 A	04-04-2000
			US	6309823 B1	30-10-2001
			US	5861242 A	19-01-1999
			US	5837832 A	17-11-1998
